

8. *Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 480 с.
9. *Nucleotide sequence of a cDNA for the common α subunit of the bovine pituitary glycoprotein hormones / J. H. Nilson, A. R. Thomason, M. T. Cserbak et al. // J. Biol. Chem.— 1983.— 258, N 8.— P. 4679—4682.*
10. *Characterization and nucleotide sequence of the gene for the common α subunit of the bovine pituitary glycoprotein hormones / R. G. Goodwin, C. L. Moncman, F. M. Rottman, J. H. Nilson // Nucl. Acids Res.— 1983.— 11, N 19.— P. 6873—6882.*
11. *Fiddes J. C., Goodman H. M.* The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones // *J. Mol. and Appl. Genet.*— 1981.— 1, N 1.— P. 3—18.
12. *Characterization of the precursors of α - and β -subunits of follitropin following cell-free translation of rat and ovine pituitary mRNAs / R. Counis, M. Corbani, M. Poissonnier, M. Jutisz // Biochem. and Biophys. Res. Commun.— 1982.— 107, N 3.— P. 998—1005.*
13. *Maurer R. A., Beck A.* Isolation and nucleotide sequence analysis of a cloned cDNA encoding the β -subunit of bovine follicle-stimulating hormone // *DNA.*— 1986.— 5, N 5.— P. 363—369.
14. *Kim K., Gordon D., Maurer R. A.* Nucleotide sequence of the bovine gene for follicle-stimulating hormone β -subunit // *Ibid.*— 1988.— 7, N 4.— P. 227—233.

Ин-т молекуляр. биологии им. В. А. Энгельгардта
АН СССР, Москва

Получено 05.07.90

УДК 577.213.3

**Л. А. Лившиц, С. А. Кравченко, В. И. Гришко,
Т. И. Бужиевская, В. С. Баранов**

НЕРАВНОВЕСНОЕ СЦЕПЛЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ДЛИНЫ РЕСТРИКЦИОННЫХ ФРАГМЕНТОВ ХРОМОСОМЫ 7 ЧЕЛОВЕКА С МУТАЦИЯМИ В ГЕНЕ МУКОВИСЦИДОЗА В УКРАИНСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

В 37 украинских семьях с риском муковисцидоза (МВ) 1:25 и среди 100 здоровых доноров проводили ДНК-анализ делеции ΔF_{508} с использованием полимеразной цепной реакции. Данную трехнуклеотидную делецию имели 65% хромосом, мутантных по гену МВ. Осуществлен анализ сцепления между тремя полиморфными маркерами (KM-19, CS.7, D7S8) и мутациями в гене МВ. Сильное неравновесное сцепление было обнаружено между ПДРФ-гаплотипами в системах KM-19/PstI и CS.7/Hin6I и делецией ΔF_{508} . Более слабое, но достоверное сцепление было между теми же гаплотипами и другими мутациями в гене МВ.

Сцепление между этими маркерами и МВ-мутациями позволяет проводить точную пре- и постнатальную диагностику МВ в большинстве семей, имеющих больного ребенка, а также дает возможность выявлять носителей мутации в гене МВ в популяции.

МВ — одно из наиболее распространенных среди европейского населения моногенное наследственное заболевание с аутосомно-рецессивным характером наследования. По данным ряда зарубежных и отечественных авторов, каждый 20-й представитель белой расы может являться гетерозиготным носителем мутантного гена, ответственного за развитие данной патологии, в среднем один из 2000 новорожденных болел МВ и умирает преимущественно в раннем возрасте [1].

После локализации гена МВ на хромосоме 7 человека в районе 31q были выделены и клонированы маркерные последовательности, фланкирующие предполагаемый ген МВ и имеющие полиморфные сайты узнавания некоторыми рестрикционными эндонуклеазами [2]. Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) в локусах D7S23 (системы KM-19/PstI, CS.7/Hin6I) и D7S8 (D7S8/PstI) успешно используется для пренатальной диагностики МВ в семьях высокого риска [3, 4]. Однако диагностическая ценность ПДРФ ДНК в каждой конкретной популяции определяется частотой полиморфных

© Л. А. ЛИВШИЦ, С. А. КРАВЧЕНКО, В. И. ГРИШКО, Т. И. БУЖИЕВСКАЯ,
В. С. БАРАНОВ, 1991

гаплотипов и характером ассоциации их с анализируемыми мутациями. Показано, что данные показатели варьируют в разных популяциях [5]. На основании этих данных высказывалось предположение о существовании нескольких мутаций в гене МВ, распространенных в популяциях с разной частотой [6].

Одним из наиболее выдающихся событий в медицинской генетике стало открытие гена МВ. В 1989 г. совместными усилиями ученых США и Канады [7] был точно идентифицирован ген, следствием мутаций в котором является развитие МВ. На основе анализа его нуклеотидной последовательности был детально описан трансмембранный белок, дефекты которого приводят к данной патологии. Этот белок клас-

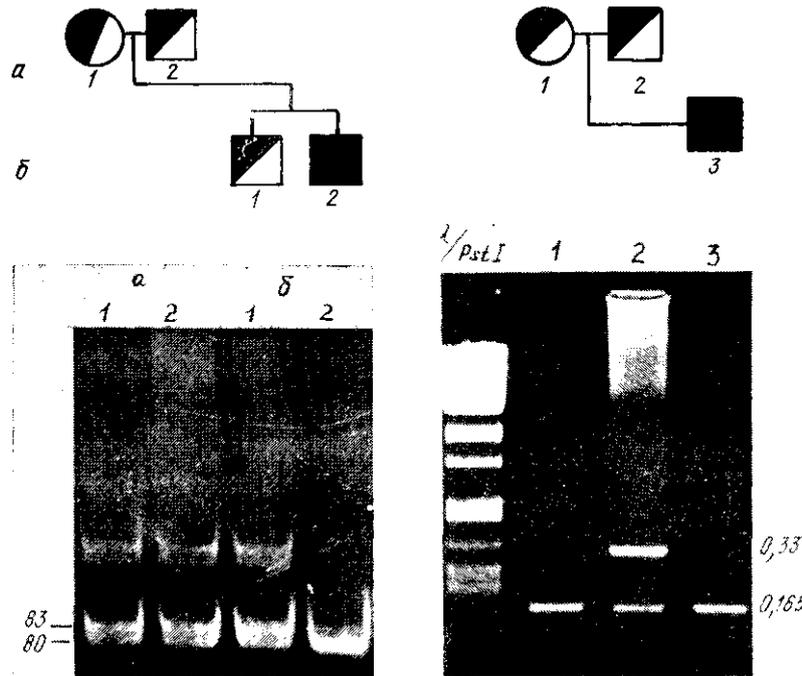


Рис. 1. ДНК-анализ делеции ΔF_{508} в гене МВ в семье С., имеющей больного ребенка (12 %-ный ПААГ, размер рестрикционных фрагментов указан в п. н.): а — ДНК матери (1), ДНК отца (2); б — ДНК здорового ребенка (1), ДНК пробанда (2)

Fig. 1. DNA-analysis deletion delta F_{508} of cystic fibrosis gene in family S. with affected child by means of polymerase chain reaction

Рис. 2. Анализ ПДРФ ДНК, сплещенного с геном МВ, в семье Г. методом специфической амплификации (система $CS.7/Hin61$): 1 — ДНК матери; 2 — ДНК отца; 3 — ДНК больного ребенка

Fig. 2. RFLP analysis in family G. with cystic fibrosis child by means of polymerase chain reaction ($CS.7/Hin61$)

са Р-гликопротеинов назван трансмембранным белком муковисцидоза (ТРБМ). Показано, что размер гена МВ составляет 250 тыс. п. н. и он включает в себя 24 экзона [7, 8]. Кроме того, в 10-м экзоне данного гена обнаружена трехнуклеотидная делеция ΔF_{508} , приводящая к утрате фенилаланина в 508-м положении ТРБМ [9]. Установлено, что подобная мутация встречается в среднем на 70 % МВ-хромосом и ее частота варьирует в разных популяциях [6]. Другие мутации в данном гене, по-видимому, выявляются гораздо реже и диагностика их по-прежнему затруднена.

Целью данных исследований было изучение распространения делеции ΔF_{508} в украинских семьях с высоким риском МВ и у здоровых доноров Киева. Кроме того, анализировали ассоциацию данной деле-

ции неизвестных пока мутаций в гене МВ с полиморфными гаплотипами в маркерных системах *KM-19/PstI*, *CS.7/Hin6I*, *D7S8/PstI*.

Материалы и методы. ДНК-анализ делеции ΔF_{508} проведен у 111 человек в 37 семьях с высоким риском МВ из центральной части Украины (37 детей, больных муковисцидозом, 74 гетерозиготных носителя данного гена — родителей больных детей). ДНК из клеток периферической крови выделяли по общепринятому методу [10]. Делецию ΔF_{508} детектировали с использованием полимеразной цепной реакции специфической амплификации участка ДНК *in vitro*, в котором эта делеция может иметь место. Для этого применяли олигонуклео-

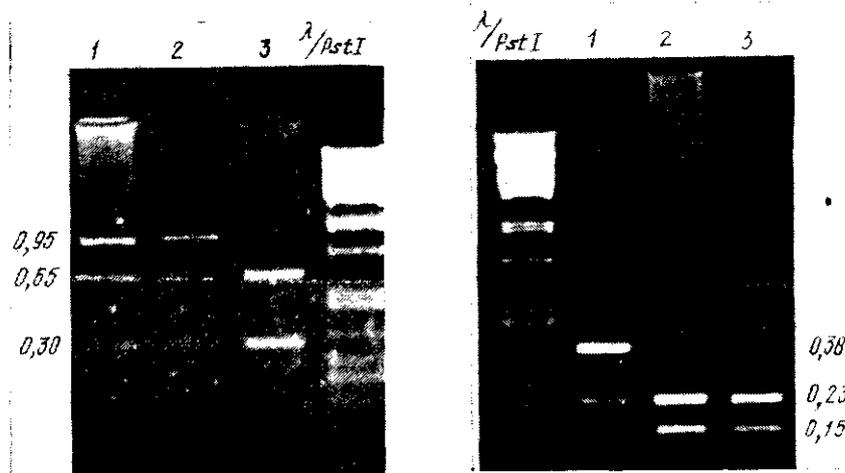


Рис. 3. Анализ ПДРФ ДНК, сцепленного с геном МВ, в семье А. методом специфической амплификации (система *KM-19*): 1 — ДНК матери; 2 — ДНК отца; 3 — ДНК больного ребенка

Fig. 3. RFLP analysis in family A. with cystic fibrosis child by means of polymerase chain

Рис. 4. Анализ ПДРФ ДНК, сцепленного с геном МВ, в семье О. методом специфической амплификации (система *D7S8/PstI*): 1 — ДНК матери; 2 — ДНК отца; 3 — ДНК больного ребенка (1,5 %-ный агарозный гель; размер фрагментов в тыс. п. н.)

Fig. 4. RFLP analysis in family O. with cystic fibrosis child by means of polymerase chain reaction (*D7S8/PstI*)

тидные праймеры, гомологичные нуклеотидным последовательностям, фланкирующим данный участок [9]. Полимеразную цепную реакцию осуществляли в автоматическом режиме на термоциклере Perkin Elmer («Cetus», США) с использованием реакционной смеси, описанной ранее [11, 12]. 30 циклов реакции проводили по схеме: 30 с — денатурация ДНК (94 °С), 30 с — отжиг праймеров (55 °С), синтез ДНК — 1 мин (71 °С). Олигонуклеотидные праймеры синтезированы в НПК «Энзим» (Вильнюс). Термостабильная полимеразы из *Thermus thermophilus* производства кооператива «Плодородие» (Ленинград). Для анализа ПДРФ в локусах *D7S23* и *D7S8* полимеразную цепную реакцию проводили в участках *KM-19*, *D7S8*, *CS. 7* с последующим расщеплением продуктов амплификации эндонуклеазами рестрикции *PstI* и *Hin6I* соответственно [13]. Олигонуклеотидные праймеры с по-

следовательностями, гомологичными фланкирующим соответствующие участки *CS.7*, *KM-19* и *D7S8*, были синтезированы сотрудником нашего института С. С. Огнянником на синтезаторе «Gene Assembler» производства фирмы «Pharmacia» (Швеция) фосфоамидитным способом в автоматическом варианте. Продукты амплификации участка с возможным наличием ΔF_{508} (15—20 мкл) идентифицировали после проведения электрофореза в 12 %-ном полиакриламидном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием (рис. 1). Выявление фрагмента величиной 80 п. н. свидетельствовало о наличии в данном геноме 7-й хромосомы с делецией ΔF_{508} , тогда как менее подвижный фрагмент размером 83 п. н. характеризовал отсутствие данного дефекта в гене *MB* [9]. Продукты амплификации в участках *CS. 7*, *KM-19*, *D7S8*, подвергшиеся гидролизу рестрицирующими эндонуклеазами *Hin6I* и *PstI* соответственно, анализировали после электрофореза в 1,5 %-ном агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием. Так, в системе *CS.7/Hin6I* фрагмент 330 п. н. соответствовал аллельному гаплотипу A_1 , а фрагмент 165 п. н. (164+166) — аллельному гаплотипу A_2 (рис. 2). В системе *KM-19/PstI* фрагмент 950 п. н. соответствовал аллельному гаплотипу B_1 , а при наличии сайта рестрикции выявлялись фрагменты величиной 650 и 300 п. н. — аллель B_2 (рис. 3). Наконец, в системе *D7S8/PstI* фрагмент 380 п. н. (отсутствие сайта рестрикции) соответствовал гаплотипу C_1 , а наличие сайта рестрикции (фрагменты 250 и 130 п. н.) соответствовало аллелю C_2 (рис. 4). Для анализа характера ассоциации мутаций в гене *MB* с полиморфными гаплотипами рассчитывали показатель неравновесного сцепления χ^2 (тетракорический критерий Пирсона) [14].

Результаты и обсуждение. Результаты ДНК-анализа делеции ΔF_{508} в семьях с высоким риском *MB* приведены в табл. 1. Полученные данные свидетельствуют о том, что в проанализированных семьях развитие *MB* в 84 % случаев обусловлено наличием делеции ΔF_{508} . В 46 % случаев данная делеция встречалась у больных *MB* в гомозиготном состоянии, а в 38 % случаев присутствовала на одной из хромосом 7 в сочетании с другой неизвестной мутацией на гомологичной хромосоме.

Лишь в 16 % случаев развитие *MB* было связано с наличием мутаций неизвестной природы в гене *MB*.

Эти данные свидетельствуют о высоком вкладе ΔF_{508} в развитие тяжелых клинических форм *MB* в украинской популяции и хорошо согласуются с таковыми, полученными для северо-американской популяции [9]. Проведенный нами ДНК-анализ делеции ΔF_{508} у 100 здоровых доноров Киева позволил выявить среди них четырех гетерозиготных носителей данной делеции. Таким образом, ориентировочная частота носителей ΔF_{508} в Киеве составляет 1 : 25. А если учесть, что

Таблица 1

Частота распределения мутаций в гене *MB* у больных детей и их родителей (облигатных гетерозиготных носителей) в украинских семьях
Frequency of cystic fibrosis gene mutations in affected children and parents (obligatory heterozygotes) in families from Ukraine

Дети, больные <i>MB</i>			Родители (облигатные гетерозиготные носители гена <i>MB</i>)		
Генотип	<i>n</i>	Частота	Генотип	<i>n</i>	Частота
CF_{Δ}/CF_{Δ}	17	0,46	CF_{Δ}/CF_N	48	0,65
CF_{Δ}/CF_x	14	0,38	CF_x/CF_N	26	0,35
CF_x/CF_x	6	0,16	—	—	—

Примечание. Здесь и в табл. 2 CF_{Δ} — делеция ΔF_{508} ; CF_x — другие мутации в гене *MB*; CF_N — нормальный аллель; *n* — количество проанализированных индивидуумов.

65 % хромосом, мутантных по гену МВ, несут данную делецию, то становится очевидным, что ДНК-анализ делеции ΔF_{508} у больных МВ в Киеве достаточно эффективен в пре- и постнатальной диагностике данного заболевания.

Тем не менее анализ полиморфных гаплотипов не теряет своей диагностической ценности в семьях, не имеющих исследуемой делеции у больного ребенка, и в случаях, когда она находится в сочетании с другой мутацией гена МВ.

Таблица 2

Сцепление ПДРФ хромосомы 7 человека с мутациями в гене МВ в украинской популяции

Linkage between cystic fibrosis gene mutations and RFLP of human chromosome 7 in Ukrain population

Полиморфная система	Число хромосом					Показатели сцепления			
	CF _N	CF _Δ	CF _N	CF _X	Всего	r _A CF _Δ	χ ² r _A CF	r _A CF _X	χ ² r _A CF _X
<i>KM-19/PstI</i>									
+	13	31	3	9	55	0,55	20,57	0,37	4,65
—	21	3	14	8	47				
Всего	34	34	17	17	102				
<i>CS.7/Hin6I</i>						0,58	24,2	0,38	4,62
+	13	33	4	10	60				
—	23	3	12	6	44				
Всего	36	36	16	16	104				
<i>D7S8/PstI</i>						0,12	0,74	0,18	1,1
+	17	14	13	10	54				
—	9	12	4	7	32				
Всего	26	26	17	17	86				

Примечание. «—» и «+» — отсутствие и наличие рестрикционного сайта соответственно; r_A — стандартный коэффициент неравновесия.

В табл. 2 приведены результаты анализа ассоциации мутаций в гене МВ с маркерными ПДРФ-гаплотипами в локусах *D7S23/KM-19/PstI*, *CS.7/Hin6I* и *D7S8/PstI*. Характер ассоциации оценивали по значению стандартного коэффициента неравновесия [14]. Полученные данные свидетельствуют о достоверном неравновесном сцеплении делеции ΔF_{508} ($r_A=0,55$) и других неизвестных мутаций ($r_A=0,37$) в гене МВ с полиморфным гаплотипом В₂ в системе *KM-19/PstI*. Аналогичная ассоциация делеции ΔF_{508} ($r_A=0,58$) и других мутаций ($r_A=0,38$) выявлена в гене МВ с полиморфным гаплотипом А₂ в системе *CS.7/Hin6I*, что согласуется с нашими данными, полученными ранее [8]. При этом следует заметить, что ассоциация гаплотипов А₂ и В₂ с делецией ΔF_{508} представляется более тесной по сравнению с таковой для других, неидентифицированных мутаций в гене МВ. Сцепление между мутациями в гене МВ с полиморфными гаплотипами С₁ и С₂ в системе *D7S8/PstI* было равновесным.

Полученные данные по ассоциации мутаций в гене МВ с полиморфными гаплотипами в локусах *D7S23* и *D7S8* позволяют сделать вывод о высокой информативности полиморфных систем *KM-19/PstI* и *CS.7/Hin6I* локуса *D7S23* для диагностики МВ на Украине.

Резюме

У 37 українських сім'ях із ризиком муковісцидозу (МВ) 1:25 та серед 100 здорових донорів проведений ДНК-аналіз делеції ΔF_{508} із застосуванням полімеразної ланцюгової реакції. Триплектоидну делецію мали 65 % хромосом, мутантних по гену МВ. Здійснено аналіз зчеплення між трьома поліморфними маркерами (*KM-19*, *CS.7*, *D7S8*) та мутациями в гені МВ. Сильне нерівноважне зчеплення було виявлено між ПДРФ-гапто-

типами у системах *KM-19/PstI* та *CS7/Hin6I* і делецією ΔF_{508} . Більш слабе, але достовірне зчеплення було між тими ж гаплотипами та іншими мутаціями в гені *MB*.

Зчеплення між цими маркерами і *MB*-мутаціями дозволяє провести точну пре- та постнатальну діагностику *MB* в більшості сімей, що мають хвору дитину, а також дає змогу виявити носіїв мутації в гені *MB* в популяції.

Summary

DNA analysis of deletion ΔF_{508} was performed in 37 Ukrainian cystic fibrosis families with 1:25 risk of cystic fibrosis and 100 healthy donors used PCR technology. A deletion of three base pairs was detected in 65 percent of chromosomes carrying cystic fibrosis mutation. The linkage analysis between three polymorphic markers (*KM-19*, *CS.7*, *D7S8*) and cystic fibrosis mutations was performed. The linkage disequilibrium was found between RFLP-gaplotypes of chromosome 7 (*KM-19/PstI* and *CS7/Hin6I*) and CF-deletion ΔF_{508} .

weaker but significant disequilibrium was found between *KM-19/PstI* and *CS.7/Hin6I* and unknown one. The linkage between these markers and CF-mutations for the Ukrainian population permit to perform accurate pre- and postnatal diagnosis cystic fibrosis in most families with affected persons and also allows carriers detection in population.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Harris A., Super M. Cystic fibrosis. The fact.— Oxford: Univ. press, 1987.— 133 p.
2. Tsui Lap-Chee. Genetic markers on chromosome 7 // *J. Med. Genet.*— 1988.— 25, N 5.— P. 294—306.
3. Feldman C. L., Williamson R. Prenatal diagnosis of cystic fibrosis by DNA amplification for detection of *KM-19* and *CS.7* polymorphism // *Lancet.*— 1988.— N 9.— P. 102.
4. Northrup H., Rosenbloom C., Brien W. E. Additional polymorphism for *D7S8* linked to cystic fibrosis including detection by DNA amplification // *Nucl. Acid. Res.*— 1989.— 17, N 4.— P. 1784.
5. Linkage disequilibrium between cystic fibrosis and linked DNA polymorphism in Italian families; a collaborative study / X. Estvill, M. Farrall, R. Williamson et al. // *Amer. J. Hum. Genet.*— 1988.— 43, N 1.— P. 23—28.
6. Allelic association of the cystic fibrosis locus and two DNA markers, *XV-2C* and *KM-19* in 55 German families / M. Krawczak, D. S. Konecki, J. Schmidtke et al. // *Hum Genet.*— 1988.— N 80.— P. 78—80.
7. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping / J. M. Rommens, M. C. Januzzi, B. Kerem et al. // *Science.*— 1989.— 245, N 4922.— P. 1059—1065.
8. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA / J. R. Riordan, J. M. Rommens, B. Kerem et al. // *Ibid.*— P. 1066—1071.
9. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis / B. Kerem, J. M. Rommens, J. A. Buchanan et al. // *Ibid.*— P. 1072—1077.
10. Erste ergebnisse bei der genomischen Carrierdiagnostik in Risikosippen mit Haemophilie A and B in der DDR / M. Wehnert, F. H. Herrman, H. Metzke et al. // *Z. gesamte inn. Med.*— 1988.— 43, N 16.— S. 441—444.
11. Аналіз поліморфізму ДНК в участках, тесно сцепленных с геном муковисцидоза, в популяции Киева / Л. А. Лившиц, В. П. Гришко, С. А. Кравченко и др. // *Биополимеры и клетка.*— 1990.— 6, № 2.— С. 60—64.
12. Значение медико-генетического консультирования для ранней диагностики муковисцидоза / Л. А. Лившиц, Н. Г. Горovenko, Т. Э. Иващенко и др. // *Врачеб. дело.*— 1990.— № 4.— С. 101—103.
13. Маниатис Т., Фрич Е. Е., Сэмбрук Ж. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1985.— 420 с.
14. Лакин Г. Ф. Биометрия.— М.: Высшая школа, 1980.— 291 с.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 18.10.90